过氧化氢诱导斜带石斑鱼原代肝细胞氧化损伤模型的构建

张润蔚　王　玲　张春晓　宋　凯*

（集美大学水产学院，厦门市饲料检测与安全评价重点实验室，厦门 361021）

摘　要：本试验以斜带石斑鱼原代肝细胞为研究对象，以过氧化氢作为刺激源，以肝细胞存活率和抗氧化指标的变化为判断指标，旨在建立稳定的斜带石斑鱼原代肝细胞氧化损伤模型。在原代肝细胞培养液中分别添加 0（对照）、100、200、400、600、800 和 1 000 μmol/L H_2O_2，使之分别作用 2、4、6、8、12 和 24 h，共 42 组，每组 10 个重复，测定肝细胞存活率。在得出适宜过氧化氢作用时间的基础上，使每个浓度的过氧化氢（每个过氧化氢浓度设 6 个重复）作用于肝细胞适宜时间后，收集肝细胞和培养液测定抗氧化指标，筛选使肝细胞发生氧化损伤的适宜过氧化氢作用浓度。结果显示：800 μmol/L 过氧化氢作用肝细胞 8 h，斜带石斑鱼肝细胞的存活率降低至 61.98%；800 和 1 000 μmol/L 组与其他各组相比，肝细胞超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶（600 μmol/L 组除外）和过氧化氢酶活性显著降低（$P<0.05$），丙二醛与脂质过氧化物含量显著升高（$P<0.05$），但 800 和 1 000 μmol/L 组之间差异不显著（$P>0.05$）。以上结果表明，过氧化氢作用浓度为 800 μmol/L、作用时间为 8 h，可作为建立斜带石斑鱼肝细胞氧化损伤模型的适宜条件。

关键词：斜带石斑鱼；原代肝细胞；过氧化氢；氧化损伤模型

中图分类号：Q813.1$^+$1；S917.4　　文献标识码：A　　文章编号：

石斑鱼为我国重要的海水养殖鱼类之一。近年来，高密度养殖胁迫、水体富营养化与营养失衡等集约化养殖带来的各种不利因素严重阻碍了石斑鱼产业化发展[1-3]。动物在受到外

收稿日期：2016-10-25

基金项目：石斑鱼保肝型饲料添加剂的研发与应用（2016N0023）；福建省科技厅(重点)项目“应用蛋白质组学技术研究皮质醇对斜带石斑鱼肝细胞代谢的影响机制”（31302198）；国家自然科学基金（青年）（31302198）；福建省科技重大专项专题“石斑鱼健康养殖技术及高效配合饲料的研发和推广应用”(2016NZ0001-3)

作者简介：张润蔚（1991-），女，河北邢台人，硕士研究生，从事水产生物学科学专业研究。E-mail: 1659002099@qq.com

*通信作者：宋　凯，副教授，硕士生导师，E-mail: songkai@jmu.edu.cn

界有害因素作用时，会发生机体代谢功能紊乱[4-6]。由于鱼类是水生低等脊椎动物，更易受到外界不良环境的影响，而适当的外界应激反应可使鱼类逐步适应生活环境，提高其免疫效能，从而增加渔业的产量[6-7]，但外来的过度氧化应激刺激不仅影响鱼类的生产能力，同时还会诱发多种鱼类疾病，甚至造成大范围的死亡[8-10]。

肝脏是脊椎动物机体新陈代谢重要的器官，会不断地调整其细胞的生理状态以适应环境变化[11]。研究表明，肝细胞能够行使绝大部分肝脏的功能[12]，因此，国内外研究者多采用体外培养的肝细胞代替活体动物来研究某些物质的毒理作用或代谢途径等。细胞模型的建立不仅可以减少试验动物的数量，而且具有操作简便、可重复性高，同时避免体内复杂因素干扰等优点[13]，已广泛应用于毒理学、药理学等研究领域[14-15]。

近年来，学者们对一些经济鱼类,如鲤鱼[16]（*Cyprinus carpio*）、罗非鱼[17]（*Oreochromis mossambicus*）、蓝点石斑鱼[18](*Channa punctatus*)及鲶鱼[19]（*Silurus asotus*）等的个体及单细胞的氧化应激反应相继开展研究，然而有关石斑鱼肝脏氧化损伤方面的研究非常匮乏。基于目前国内外相关研究报道和研究水平，本试验以斜带石斑鱼原代培养肝细胞为试验材料，测定细胞各种抗氧化指标作为参考，以确定建立的斜带石斑鱼过氧化氢肝细胞氧化损伤模型最佳条件。

1 材料与方法

1.1 试验材料

斜带石斑鱼[体重为（50±2） g，长度为（13.0±0.8） cm]由集美大学海水养殖试验场提供。

1.2 主要试剂

H_2O_2 原液、0.25%胰蛋白酶、L-15 培养基、磷酸盐缓冲液（PBS）、青霉素(10 000 IU/mL)、链霉素(10 000 μg/mL)、两性霉素 B、胰岛素、胎牛血清，均购于 Gibco 公司（美国）；台盼蓝、二甲基亚砜(DMSO)，均购于上海捷瑞生物工程有限公司；指标测定所用测试盒均购

于南京建成生物工程研究所；其他所有化学试剂均为分析纯。

1.3 斜带石斑鱼原代肝细胞的培养

按照骆源等[20]的方法获得斜带石斑鱼原代肝细胞，取对数生长期的细胞，用完全培养基(L-15 培养基)调整细胞密度至 2×10^5 个/mL，接种于 25 cm^2 培养瓶[培养液为含有 20%胎牛血清（FBS）的 L-15 培养基]中，置于 25 ℃、5% CO_2 培养箱中进行原代培养。本试验利用血球计数板计数，以细胞活力（将细胞悬液与 0.5%台盼蓝染液按 1:1 体积比混合，1～2 min 后于血球计数板上计数，活细胞呈透明卵圆形，死细胞被染成蓝色，用活细胞占计数细胞的百分比表示细胞活力)大于 90%的原代肝细胞用于后续试验操作。

1.4 试验设计

采用 96 孔细胞培养板，每孔接种细胞悬液 100 μL，接种浓度在 2×10^5 个/mL。在原代肝细胞培养液中分别添加 0（对照）、100、200、400、600、800 和 1 000 μmol/L H_2O_2，使之分别作用 2、4、6、8、12 和 24 h，共 42 组，每组 10 个重复，测定肝细胞存活率。

以 H_2O_2 作用后的肝细胞存活率为主要指标初步筛选 H_2O_2 作用时间。在获得 H_2O_2 适宜作用时间的基础上，使每个浓度的 H_2O_2（每个 H_2O_2 浓度设 6 个重复）作用于肝细胞适宜时间后，收集肝细胞和培养液测定抗氧化指标，进一步筛选使肝细胞发生氧化损伤的适宜 H_2O_2 作用浓度[21-22]。

1.5 肝细胞存活率和抗氧化指标的测定及方法

采用四唑蓝(MTT)比色法[23]测定吸光度（OD）值后，根据下列公式计算肝细胞的存活率：

肝细胞存活率（%）=100×不同浓度 H_2O_2 组 $OD_{570\ nm}$/对照组 $OD_{570\ nm}$。

谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）活性采用二硫代二硝基苯甲酸法测定，超氧化物歧化酶（SOD）活性采用黄嘌呤氧化酶法测定，过氧化氢酶（CAT）活性采用比色法测定，丙二醛（MDA）含量采用硫代巴比妥酸法测定，脂质过氧化物（LPO）含量采用荧光测定法。

上述指标的详细测定方法参照南京建成生物工程研究所试剂盒说明书进行。

1.6 数据处理

所有数据经 Origin 2015 进行整理和计算，用平均值±标准误(mean±SE)表示。采用 SPSS 19.0 软件进行数据统计和差异显著性分析，先对数据进行方差齐性检验，如满足差异显著性分析条件则对数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA)，若组间存在显著性差异，则再采用 Duncan 氏法进行多重比较检验组间差异显著性，以 P<0.05 表示差异显著，P>0.05 表示差异不显著。

2 结果与分析

2.1 H_2O_2 作用浓度和作用时间对肝细胞存活率的影响

由表 1 可见，在每一作用时间下，随着 H_2O_2 作用浓度的增加，肝细胞存活率呈降低趋势。当作用时间≥8 h 时，600～1 000 μmol/L 组肝细胞存活率显著低于同一作用时间下 0～400 μmol/L 组(P＜0.05)。当 H_2O_2 作用浓度增加到 800 和 1 000 μmol/L 时，相比于作用 2、4 h 时，作用时间为 6～24 h 时肝细胞存活率均急剧减少，肝细胞存活率分别从 2 h 的 89.83%和 88.98%降低到 24 h 的 44.53%和 40.88%，细胞死亡率高达 54%～60%。本试验选择细胞存活率在 50%～65%作为判别指标[21]，在其范围内的 H_2O_2 作用浓度与作用时间分别是 800 μmol/L H_2O_2 作用细胞 8 h、800 μmol/L H_2O_2 作用细胞 12 h 和 1 000 μmol/L H_2O_2 作用细胞 8 h，其细胞存活率分别为 61.98%、50.19%和 60.08%。上述结果显示 800～1 000 μmol/L 的 H_2O_2 作用肝细胞 8 h 后，可浓度依赖性地降低肝细胞存活率，肝细胞存活率降低程度适中，因此选择 8 h 作为 H_2O_2 的适宜作用时间。

表 1　H_2O_2 作用浓度和作用时间对肝细胞存活率的影响

Table 1　Effects of action concentration and action time of H_2O_2 on survival rate of hepatocytes　%

H_2O_2 作用浓度 H_2O_2 action concentration/(μmol /L)	作用时间 Action time/h					
	2	4	6	8	12	24
100	94.07±5.08^{a}	98.37±3.98^{a}	98.46±0.08^{a}	98.10±2.02^{a}	97.00±1.20^{a}	97.81±2.93^{a}
200	93.22±4.66^{a}	95.93±0.41^{b}	97.69±3.85^{a}	88.97±1.94^{b}	88.39±8.61^{b}	94.53±5.85^{b}
400	92.37±5.51^{a}	95.12±4.07^{b}	93.08±6.92^{b}	88.21±1.37^{b}	86.14±4.49^{b}	87.23±8.03^{c}
600	91.53±7.20^{a}	93.90±7.32^{b}	91.15±9.54^{b}	76.43±1.33^{c}	71.91±8.24^{c}	68.98±5.47^{d}
800	89.83±8.90^{a}	91.06±4.47^{b}	71.92±9.69^{c}	61.98±4.18^{d}	50.19±2.25^{d}	44.53±1.09^{e}
1 000	88.98±6.36^{a}	84.96±6.91^{c}	66.54±7.31^{c}	60.08±1.14^{d}	47.19±4.87^{d}	40.88±6.57^{e}

同列数据肩标相同字母表示差异不显著（P＞0.05），不同字母表示差异显著（P＜0.05）。

Values in the same column with the same letter superscripts mean no significant difference (P＞0.05), while with different letter superscripts mean significant difference (P＜0.05).

2.2 以原代肝细胞抗氧化指标验证氧化损伤模型的可靠性

为了验证斜带石斑鱼氧化损伤模型的可靠性，对不同 H_2O_2 作用浓度作用 8 h 后的原代肝细胞抗氧化指标进行了的测定。由表 2 可知，随着 H_2O_2 作用浓度的升高，原代肝细胞 GSH-Px、CAT 和 SOD 活性逐渐降低。除 600 μmol/L 组的 GSH-Px 活性外，800 和 1 000 μmol/L 组的 GSH-Px、CAT 和 SOD 活性显著低于其他各组(P＜0.05)，但 800 和 1 000 μmol/L 组之间无显著差异(P＞0.05)；对照组的 GSH-Px、CAT 和 SOD 活性最高，显著高于其他各组(P＜0.05)。

H_2O_2 同时对斜带石斑鱼肝细胞的脂质过氧化程度有影响，主要反映在 LPO 与 MDA 含量 2 个指标的变化上。由表 2 可知，原代肝细胞 LPO 与 MDA 含量与抗氧化指标呈现相反

的变化规律，均随着 H_2O_2 作用浓度的增加而逐渐升高。除了 100 μmol/L 组与对照组无显著差异(*P*＞0.05)外，其他 H_2O_2 作用浓度组均显著高于对照组(*P*＜0.05)，并且 200、400、600 μmol/L 组之间无显著差异(*P*＞0.05)，800 和 1 000 μmol/L 组之间无显著差异(*P*＞0.05)。

表 2　各组斜带石斑鱼原代肝细胞的抗氧化指标

Table 2　Antioxidant indexes in primary hepatocytes of *Epinephelus coioides* in each group

H_2O_2 作用浓度 H_2O_2 action concentration/(μmol/L)	谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px (U/mg prot)	超氧化物歧化酶 SOD/(U/mg prot)	过氧化氢酶 CAT/(U/mg prot)	丙二醛 MDA (nmol/mg)	脂质过氧化物 LPO (nmol/mg)
0	168.44±12.34[a]	23.98±1.09[a]	2.37±0.03[a]	1.95±0.03[a]	28.36±2.11[a]
100	134.91±4.42[b]	21.98±1.23[a]	2.26±0.14[a]	2.09±0.21[a]	30.07±1.40[a]
200	128.52±7.66[b]	15.35±0.45[b]	2.21±0.11[a]	3.29±0.33[b]	41.88±1.77[b]
400	119.06±5.09[b]	14.76±0.66[b]	2.14±0.07[a]	3.53±0.30[b]	43.93±1.89[b]
600	113.11±5.83[b,c]	13.09±0.51[b]	1.99±0.14[a]	3.65±0.16[b]	45.08±2.31[b]
800	79.08±3.07[c]	11.94±0.27[c]	1.37±0.06[b]	5.29±0.42[c]	53.75±2.88[c]
1 000	71.33±4.98[c]	10.92±0.29[c]	1.25±0.03[b]	5.43±0.37[c]	55.75±3.09[c]

同列数据肩标相同字母表示差异不显著（*P*＞0.05），不同字母表示差异显著（*P*＜0.05）。

Values in the same column with the same letter superscripts mean no significant difference (*P*＞0.05), while with different letter superscripts mean significant difference (*P*＜0.05).

3　讨　论

目前，以 H_2O_2 为应激源诱导建立细胞氧化损伤模型的方法较多，如体外培养的心肌细胞及肝脏细胞[21]，但关于建立石斑鱼原代肝细胞氧化损伤模型的研究报道极少。而且，以 H_2O_2 为应激源构建细胞氧化损伤模型的报道中，判断氧化损伤是否发生所选择的判别指标

与判别标准不同。一些研究认为，MTT 法具有诸多优点如重复性好、特异性强、准确、快速等，通过测定其 OD 值的大小即可反映出细胞数量的多少，也可反映出细胞增殖的快慢，进而可以作为建立氧化应激模型的判别指标[24-25]，但目前选择的判别标准不完全相同。通常用于建立氧化损伤模型的细胞存活率不宜过高或过低，过低的存活率说明细胞已经大量的死亡，会造成细胞不可恢复的损伤，不利于抗氧化机制的研究；过高的存活率说明细胞是处于指数增长期状态，细胞的活力较好，导致氧化后的损伤不明显，也不利后续试验的开展[26]。由此说明，建立细胞氧化损伤模型时，细胞损伤程度要适宜。H_2O_2 会导致细胞氧化损伤的原因是许多种氧自由基[如超氧阴离子自由基（O_2^-·）、羟自由基（ OH）等]产生和 H_2O_2 诱导细胞的脂质过氧化的反应，随着 H_2O_2 氧化损伤和细胞内抗氧化过程的不断进行，使生命体的抗氧化能力失衡[27]。H_2O_2 对机体造成氧化损伤，从而引起生物膜破损，细胞内环境紊乱，生物酶失活，加速生物结构和功能蛋白质的变性，反过来影响细胞的抗氧化酶活性和抗氧化能力的降低[28]。

以斜带石斑鱼肝细胞的存活率达 50%～65%作为评判标准[21]，根据此条件对 H_2O_2 作用浓度及作用时间进行初步筛选。本试验中 800 μmol/L H_2O_2 作用细胞 8 h 时肝细胞的存活率为 61.98%，符合评判标准。在此基础上，以抗氧化指标 GSH-Px、SOD、CAT 活性和 MDA、LPO 含量为判别依据，设定作用时间为 8 h，800 μmol/L H_2O_2 处理的原代肝细胞的抗氧化酶（GSH-Px、SOD 和 CAT）活性较对照组显著降低，同时脂质过氧化产物（MDA 和 LPO）含量显著提高。这说明，在 800 μmol/L H_2O_2 作用浓度下，斜带石斑鱼肝细胞内的脂质和酶系都发生了显著变化，且这种损伤不会导致细胞全部死亡，因此 H_2O_2 的最佳作用浓度选为 800 μmol/L。本研究结果与金鹿[21]利用 H_2O_2 诱导的奶牛乳腺上皮细胞氧化损伤模型检测结果类似。本研究同时发现，H_2O_2 作用浓度由 800 μmol/L 再继续增加至 1 000 μmol/L，相关指标未发生无显著变化。由此可见，800 μmol/L H_2O_2 即可对斜带石斑鱼肝细胞产生明显的氧化应激，可以作为建立氧化损伤模型时的作用浓度。综合本试验的细胞存活率和抗氧化指

标结果得出，以 H_2O_2 为应激源，建立斜带石斑鱼原代肝细胞氧化损伤模型适宜作用浓度为 800 μmol/L，作用时间为 8 h。

4 结 论

在过氧化氢诱导的斜带石斑鱼肝细胞氧化损伤模型中，肝细胞存活率和抗氧化指标(GSH-Px、SOD、CAT 活性及 MDA、LOP 含量)可以作为判别斜带石斑鱼肝细胞是否发生氧化应激的指标，建立斜带石斑鱼原代肝细胞氧化损伤模型的适宜条件为 800 μmol/L H_2O_2 作用 8 h。

参考文献：

[1] 冯连华.低盐环境对斜带石斑鱼幼鱼生长、生理的影响[D].硕士学位论文.湛江:广东海洋大学,2012:1–5.

[2] PICKERING A D.Growth and stress in fish production[J].Aquaculture,1993,111(1/2/3/4):51–63.

[3] WEN H L,FENG L,JIANG W D,et al.Dietary tryptophan modulates intestinal immune response,barrier function,antioxidant status and gene expression of TOR and Nrf2 in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J].Fish & Shellfish Immunology,2014,40(1):275–287.

[4] WEI X,QI Y M,ZHANG X N,et al.ROS act as an upstream signal to mediate cadmium-induced mitophagy in mouse brain[J].Neurotoxicology,2015,46:19–24.

[5] YE J L,HAN Y T,CHEN X H,et al.*L*-carnitine attenuates H_2O_2-induced neuron apoptosis via inhibition of endoplasmic reticulum stress[J].Neurochemistry International,2014,78:86–95.

[6] 崔素丽.高温下大黄素对团头鲂生长、血液指标及抗氨氮应激的影响[D].硕士学位论文.南京:南京农业大学,2012:1–4.

[7] SAFARI O,ATASH M M S,PAOLUCCI M.Effects of dietary *L*-carnitine level on growth performance,immune responses and stress resistance of juvenile narrow clawed

crayfish,*Astacus leptodactylus leptodactylus* Eschscholtz,1823[J].Aquaculture,2015,439:20–28.

[8] 王国强,王雯.应激反应对鱼类影响的研究进展[J].安徽农业科学,2009,37(24):11579–11580.

[9] 黄建,汤茜,姚卓凤,等.水霉菌感染鲤诱导氧化应激发生的研究[J].湖北农业科学,2015,54(22):5677–5681.

[10] 王秋举.L-肉碱对 H_2O_2 诱导氧化应激的两种鱼细胞抗氧化功能影响及其机理研究[D].博士学位论文.长春:吉林农业大学,2015:34–39.

[11] SEGNER H.Isolation and primary culture of teleost hepatocytes[J].Comparative Biochemistry and Physiology Part A:Molecular & Integrative Physiology,1998,120(1):71–81.

[12] 喻文娟,李聃,杨先乐,等.大口黑鲈原代肝细胞的培养及其应用于 CYP450 活性的诱导[J].海洋渔业,2008,30(01):31–36.

[13] PESONEN M,ANDERSSON T B.Fish primary hepatocyte culture; an important model for xenobiotic metabolism and toxicity studies[J].Aquatic Toxicology,1997,37(2/3):253–267.

[14] NETO F F,ZANATA S M,RANDI M A F,et al.Hepatocytes primary culture from the Neotropical fish,trahira *Hoplias malabaricus* (Bloch)[J].Journal of Fish Biology,2006,69(5):1524–1532.

[15] HESTERMANN E V,STEGEMAN J J,HAHN M E.Serum withdrawal leads to reduced aryl hydrocarbon receptor expression and loss of cytochrome P4501A inducibility in PLHC-1 cells[J].Biochemical Pharmacology,2002,63(8):1405–1414.

[16] MUSTAFA S A,KARIEB S S,DAVIES S J,et al.Assessment of oxidative damage to DNA,transcriptional expression of key genes,lipid peroxidation and histopathological changes in carp *Cyprinus carpio* L. Following exposure to chronic hypoxic and subsequent

recovery in normoxic conditions[J].Mutagenesis,2015,30(1):107–116.

[17] ABDEL-DAIM M M,ABDELKHALEK N K M,HASSAN A M.Antagonistic activity of dietary allicin against deltamethrin-induced oxidative damage in freshwater Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*[J].Ecotoxicology and Environmental Safety,2015,111:146–152.

[18] BEGAM M,SENGUPTA M.Immunomodulation of intestinal macrophages by mercury involves oxidative damage and rise of pro-inflammatory cytokine release in the fresh water fish *Channa punctatus* Bloch[J].Fish & Shellfish Immunology,2015,45(2):378–385.

[19] MENEZES C,MARINS A,MURUSSI C,et al.Effects of diphenyl diselenide on growth,oxidative damage,and antioxidant response in silver catfish[J].Science of the Total Environment,2016,542:231–237.

[20] 骆源,张春晓,王玲,等.斜带石斑鱼肝细胞分离及原代培养方法的建立[J].水产学报,2016,40(4):558–565.

[21] 金鹿.维生素A对奶牛乳腺硒蛋白合成及抗氧化功能影响机理的研究[D].博士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2014:38–40.

[22] RICHTER M,NICKEL C,APEL L,et al.SK channel activation modulates mitochondrial respiration and attenuates neuronal HT-22 cell damage induced by H_2O_2[J].Neurochemistry International,2015,81:63–75.

[23] STOCKERT J C,BLÁZQUEZ-CASTRO A,CAÑETA M,et al.MTT assay for cell viability:intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets[J].Acta Histochemica,2012,114(8):785–796.

[24] LIU Y,PETERSON D A,KIMURA H,et al.Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction[J].Journal of Neurochemistry,1997,69(2):581–593.

[25] 文金隆.天麻酚性成分对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用研究[D].硕士学位论文.昆明:云南中医学院,2013:34–35.

[26] 齐晓龙,赵芹,张亚男,等.过氧化氢诱导产蛋鸡原代肝细胞氧化应激模型的建立[J].中国畜牧杂志,2013,49(11):49–52.

[27] 方允中,杨胜,伍国耀.自由基稳衡性动态[J].生理科学进展,2004,35(3):199–204.

[28] 任泽林,霍启光,曾虹,等.氧化鱼油对鲤鱼生产性能和肌肉组织结构的影响[J].动物营养学报,2001,13(1):59–64.

Establishment of Oxidative Damage Model of Primary Hepatocytes of Grouper (*Epinephelus coioides*) Induced by Hydrogen Peroxide

ZHANG Runwei WANG Ling ZHANG Chunxiao SONG Kai*

（*Xiamen Key Laboratory for Feed Quality Testing and Safety Evaluation, Fisheries College, Jimei University, Xiamen* 361021, *China*）

Abstract: In this experiment, using primary hepatocytes of grouper (*Epinephelus coioides*) as study object, hydrogen peroxide (H_2O_2) as stress source and hepatocytes survival rate and antioxidant indexes as judgment indices, aimed to establish the stable oxidative damage model of primary hepatocytes of grouper. The concentrations of 0 (control), 100, 200, 400, 600, 800 and 1 000 μmol/L H_2O_2 were added in the cultured fluid of primary hepatocytes, and were cultured by 2, 4, 6, 8, 12 and 24 h, respectively. There were 42 groups and each group had 10 replicates. After culturing, the survival rate of hepatocytes was detected. Based on the appropriate action time was obtained, each concentration of H_2O_2 （each concentration of H_2O_2 had 6 replicates） was used to culture hepatocytes for appropriate time. After culturing, the hepatocytes and cultured fluid were

---

*Corresponding author, associate professor, E-mail: songkai@jmu.edu.cn （责任编辑 菅景颖）

collected to determined antioxidant indexes, in order to select the appropriate action concentration of H_2O_2 ensuring oxidative damage to hepatocytes. The results showed that the survival rate of hepatocytes induced by 800 μmol/L H_2O_2 at 8 h was reduced to 61.98%. The experiment also revealed that the 800 and 1 000 μmol/L group was significantly decreased the activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase (except 600 μmol/L group) and catalase ($P<0.05$), and significantly increased the contents of malondialdehyde and lipid peroxidation compared with other groups ($P<0.05$). However, the 800 and 1 000 μmol/L groups had no significant difference ($P>0.05$). The results manifest that 800 μmol/L H_2O_2 incubated for 8 h can be used as a suitable method to establish oxidative damage model of primary hepatocytes of grouper.

Key words: grouper (*Epinephelus coioides*); primary hepatocytes; hydrogen peroxide; oxidative damage model